

DOKTORI (PhD ÉRTEKEZÉS) TÉZISEI

DR. PÓSA ROLAND

**KAPOSVÁRI EGYETEM
AGRÁR- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR**

2014

KAPOSVÁRI EGYETEM
ÁLLATTUDOMÁNYI KAR
Élettani és Állathigiéniai Tanszék

A doktori iskola vezetője:

DR. KOVÁCS MELINDA
az MTA levelező tagja

Témavezető:

DR. KOVÁCS MELINDA
az MTA levelező tagja
egyetemi tanár

Társ témavezető:

DR. MAGYAR TIBOR
az MTA doktora
intézet igazgató
MTA ATK Állatorvos-tudományi Kutatóintézete
Budapest

SERTÉSEK KOMPLEX LÉGÚTI MEGBETEGEDÉSEINEK
KORSZERŰ KÉPALKOTÓ ELJÁRÁSOKRA ALAPOZOTT
VIZSGÁLATA

Készítette:

DR. PÓSA ROLAND
Kaposvár

2014.

A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉS

Az elmúlt néhány évtized során a sertéságazatban is ugrásszerűen megnőtt a termelékenység, amely az állatállományok növekedésével, koncentráldásával, az intenzív tartástechnológiák elterjedésével vált elérhetővé, azonban ez magával hozta – többek között – a légzőszervi megbetegedések előfordulásának drasztikus emelkedését is. A gyakran tömegesen jelentkező légzőszervi megbetegedések túlnyomó többségében kevert, több kórokozó együttes jelenlétében kialakuló kórképekkel kell számolnunk, amely összetett okú betegséget ma már főként sertés légzőszervi betegség komplex (angolszász néven porcine respiratory disease complex - PRDC) néven említ a szakirodalom.

A *M. hyopneumoniae*, mint az egyik legelterjedtebb légzőszervi kórokozó több évtizede meghatározó szerepet tölt be a légzőszervi betegségek kialakításában és rendszerint ehhez társulnak az egyéb patogén mikroorganizmusok (*A. pleuropneuminae*, *B. bronchiseptica* és *P. multocida*) alakul ki összetett légzőszervi kórkép. A többi légzőszervi kórokozó elterjedtségében már nagyobb eltérés tapasztalható, azonban az elmúlt két évtizedben számos új kórokozó jelent meg, illetve vált ismertté, melyek jelentősége meghatározó lett a PRDC kialakulásban, mint a PRRS vírus, a sertés circovírus 2-es típusa és a sertés influenza vírus új törzsei, amelyek az utóbbi 20 évben ugyancsak világszerte elterjedtek és komoly veszteségeket okoznak a világ sertéstartó országaiban.

A torzító orrgyulladás a sertések úgyszintén régóta ismert és széles körben elterjedt betegsége, amelyben két kórokozó baktérium, a *B. bronchiseptica* és a *P. multocida* toxintermelésre képes törzsei közötti kölcsönhatásnak tulajdonítanak elsődleges szerepet. Ezt a két kórokozót gyakran izolálják a sertés légútjaiból, és jelentős szerepet játszanak a sertések

légzőszervi betegség komplex kialakulásában. A szakirodalmi adatok alapján a *P. multocida* toxintermelésre képes törzseit gyakrabban találják meg a felső légutakra korlátozódó elváltozásokban, míg a tüdőben zajló folyamatokban inkább a toxintermelésre nem képes *P. multocida* törzsek játszanak szerepet.

A takarmány- és élelmiszer-alapanyagokat fertőző mikroszkópikus fonalas gombák számos toxint (mikotoxint) termelnek, amelyek a talaj-növény-állat-ember táplálékláncba épülve igen jelentős közegészségügyi veszély forrásai. Egyúttal igen jelentős az állattenyésztésnek okozott gazdasági károk mértéke is. A fumonizinek (FB₁, FB₂, FB₃, FB₄) a mikotoxinok viszonylag újabban, 1988-ban felfedezett és azonosított csoportját képezik.

Miután amerikai szerzők először leírták a sertésekben kiváltott, bizonyítottan FB₁ toxinnak tulajdonítható PPE (porcine pulmonary edema) néven emlegetett kórképet és az ehhez kapcsolódó fő szervi elváltozásokat (tüdővizenyő, máj- és veseelfajulás), a kórtani folyamatok átfogóbb megismeréséhez vezető kutatások indultak el, de kevés vizsgálat történt eddig a legfontosabb sertés légzőszervi kórokozók által kialakított kórképekben a FB₁ toxin esetleges hajlamosító szerepét illetően. Halloy és mtsai (2005) *P. multocida* A szerotípusával, Ramos és mtsai (2010) pedig a PRRS vírussal mesterségesen fertőzött és fumonizin FB₁ toxinnal kezelt állatokban vizsgálták a mikotoxin és a fent említett kórokozók kölcsönhatását.

A Kaposvári Egyetem Élettani és Állathigiéniai Tanszékén a Diagnosztikai és Onkoradiológiai Intézettel közreműködve 1997 óta folynak olyan jellegű állatkísérletek, melyek során kidolgozták a sertések tüdejében zajló kórtani folyamatok nyomon követésére a modern képalkotó eljárások (CT, MRI) alkalmazásának alap technikáját.

A Kaposvári Egyetemen a fumonizin B₁ toxin által kialakított tüdőelváltozások kezdeti vizsgálatai a 90-es évek végén kezdődött. Az MTA-KE Állattenyésztési és Állathigiéniai Kutatócsoportja több kísérletben vizsgálta sertésben a fumonizin B₁ dózis és az expozíciós idő függvényében bekövetkező elváltozásokat, a még tolerálható FB₁ határértékek megismerése, illetve a NOEL érték meghatározása céljából (Zomborszky-Kovács et al., 2000, 2002). Ezen eredmények alapján került az új Magyar Takarmány Kódexbe az 5 mg/kg FB₁ megengedhető max. határérték, illetve az Európai Unió ajánlásába (Commission Recommendation, 2006).

Az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézetével való együttműködés 2000-re nyúlik vissza, melynek keretében sertések torzító orrgyulladásának a termelésre gyakorolt hatását vizsgálták, a betegség kórfejlődését pedig CT-vel követték nyomon. Kidolgozásra került egy SPF (meghatározott kórokozótól mentes) malac felnevelési módszer, amellyel *B. bronchiseptica*-tól és *P. multocida*-tól való mentességet lehetett elérni. A módszer alkalmas olyan fertőzési kísérletek elvégzésére, melyekhez az adott kórokozókkal nem fertőződött állatokra van szükség (Magyar és mtsai., 2003).

Figyelembe véve a kevés vizsgálat történt eddig a legfontosabb sertés légzőszervi kórokozók által kifejtett kórképek és a FB₁ esetleges hajlamosító szerepét tekintve, továbbá a sertések légzőszervi betegségeit nyomon követő, modern képalkotó eljárásra alapozott tüdővizsgálatokról is kevés szakirodalom áll rendelkezésre, a fent említett korábbi sikeres együttműködést folytatva terveztük meg a tudományos doktori munkámat.

Fő célkitűzésünk volt képalkotó diagnosztikai módszer - komputer tomográfia (CT) alkalmazásával új ismereteket szerezni a sertések egyes gyakori, fertőző eredetű légzőszervi megbetegedéseinek és kórszövettani elváltozásaikról, valamint az FB₁ toxinnak ezen kórfolyamatokban játszott

hajlamosító, feltételezhetően a kórfejlődést módosító szerepéről. Három légzőszervi kórokozót választottunk ki a modell kísérletekhez: a *B. bronchiseptica*-t, a *P. multocida* toxintermelésre képes törzsét, illetve a *M. hyopneumoniae*-t.

További célunk volt a képalkotó diagnosztikai módszer alkalmazásának továbbfejlesztése a sertések légzőszervi betegségeinek vizsgálatában, ezen belül egy számszerűsített modell kidolgozása, amely segítséget nyújthat a sertések tüdejében zajló kórfolyamatok egzakt értékeléséhez.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A doktori munkám során három kísérletet végeztünk el.

Az **1. kísérletben** egy kórokozót, a *B. bronchiseptica* által kialakított tüdőgyulladást vizsgáltuk fiatal malacokban. A tüdő CT vizsgálatainak alap metodikáját ebben a bevezető kísérletben dolgoztuk ki.

A **2. kísérletben** a *B. bronchiseptica* és a toxintermelő *P. multocida*, valamint a FB₁ toxin, amíg a **3. kísérletben** a *M. hyopneumoniae* és a FB₁ toxin összefüggéseit vizsgáltuk a sertések tüdejében, állatházi kísérletekre alapozva.

A kísérletek során a kezelési csoportok elrendezését az 1-3. táblázatban szemléltetem.

1. táblázat: Kezelési csoportok elrendezése a 1. kísérletben

Terem	Csoport	Létszám	Bb fertőzés (0.5 ml/IT; KM22 törzs)
I.	A	10	-
II.	B	20	4. napon*

2. táblázat: Kezelési csoportok elrendezése a 2. kísérletben

Terem	Csoport	Létszám	Bb fertőzés (0,5 ml/IT; KM22 törzs)	Pm fertőzés (0,5 ml/IT; LFB3 törzs)	FB ₁ kezelés (10 mg/tak.kg)
I.	A	7	-	-	-
	B	7	-	-	16. naptól a 39. napig (kísérlet végéig) *
II.	C	7	4. napon *	16. napon *	-
	D	7	4. napon *	16. napon *	16. naptól a 39. napig (kísérlet végéig) *

3.táblázat: Kezelési csoportok elrendezése a 3. kísérletben

Terem	Csoport	Létszám	FB ₁ kezelés (20 mg/tak.kg)	Mh fertőzés (0,5 ml/IT; Mp 496 törzs)
I.	A	7	-	-
	B	7	16. naptól a 58. napig (kísérlet végéig) *	-
II.	C	7	-	30. napon *
	D	7	16. naptól a 58. napig (kísérlet végéig) *	30. napon *

A táblázatokban használt rövidítések és jelölések jelentése:

Bb= *Bordetella bronchiseptica*

Pm= *Pasteurella multocida* D

Mh= *Mycoplasma hyopneumoniae*

IT – intratracheális fertőzés légsötubuson keresztül

* malacok érkezése a 0. nap, a feltüntetett számok a kísérleti napokat jelentik

Az 1. és 2. kísérlet 39 napig, a 3. kísérlet 58 napig tartott, amely időtartamot a kiválasztott kórokozók esetében szakirodalmi adatok figyelembe vételével állapítottunk meg.

A tüdőben kialakult elváltozások CT vizsgálatokra alapozott időbeni nyomonkövetését bakteriológiai, szerológiai és szfingolipid profil vérvizsgálatokkal, a kísérlet végén pedig kórbonctani és kórszövettani vizsgálatokkal egészítettük ki (4. táblázat).

4.táblázat: Az alkalmazott vizsgálati módszerek a kísérletekben

Kísérlet	Elvégzett vizsgálat	Elvégzett vizsgálatok időpontjai*
1. kísérlet	klinikai tünetek, testhőmérséklet	A kísérlet során naponta.
	testsúlymérés CT vizsgálat bakteriológiai vizsgálat szerológiai vizsgálat	4., 16., 25., 39. nap
	kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok	39. nap
2. kísérlet	klinikai tünetek, testhőmérséklet	A kísérlet során naponta.
	testsúlymérés CT vizsgálat bakteriológiai vizsgálat szerológiai vizsgálat	4., 16., 25., 39. nap
	szfingolipid profil vizsgálat	25., 39. nap
	kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok	39. nap
3. kísérlet	klinikai tünetek, testhőmérséklet	A kísérlet során naponta.
	testsúlymérés CT vizsgálat bakteriológiai vizsgálat szerológiai vizsgálat szfingolipid profil vizsgálat	30., 44., 58. nap
	szfingolipid profil vizsgálat	58. nap
	kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok	58. nap

* malacok érkezése a 0. nap, a feltüntetett számok a kísérleti napokat jelentik

EREDMÉNYEK

A kísérletek során egy esetben sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az egyes kezelési csoportok testtömeg gyarapodásában.

1. kísérlet

A fertőzést követő 4. napon a B. csoportban enyhe savós orrfolyással kísért, tüsszögés, hortyogás és enyhe köhögés volt megfigyelhető. A fertőzést követő 16. napon elvégzett CT vizsgálat igazolta a *B. bronchiseptica* megtelepedését a fiatal malacok tüdejében, mivel a fertőzött állatok 95%-ban tapasztaltunk elváltozást. A kórbonctani vizsgálatok alátámasztották a CT felvételeken tapasztalt elváltozásokat és azok lokalizációját. Az elváltozások főként az elülső, középső és a hátulsó lebeny craniális harmadában jelentkeztek. Az érintett tüdőkben akut hurutos gyulladást, krónikusba hajló területekkel és vérzéssel tarkázottan találtunk néhány állatban szövődményes mellhártyagyulladással.

2. kísérlet

A kísérlet során három malac hullott el - egyik sem felnevelésre visszavezethető okok miatt. A C. csoportból 1 állat egy nappal a *P. multocida* fertőzés után hullott el. A D. csoportból két állat 8 illetve 18 nappal a *P. multocida* fertőzés után hullottak el. A boncolás során az elhullott 3 és még élő 5 állatban (2 állat a C. csoportból, 3 állat a D. csoportból) találtunk különböző súlyosságú broncho-pneumóniát, akut hurutos gyulladást, krónikusba hajló területekkel, valamint néhány állatban szövődményes, vérzésekkel tartázott mellhártyagyulladást láttunk.

A CT felvételek elemzésekor a *B. bronchiseptica* fertőzés után a kísérlet 16. napján (2. CT vizsgálat) a C. csoportból 3, a D. csoportból pedig 5 állatnál találtunk már elváltozásokat a tüdőben. A tüdőgyulladásra utaló elváltozások a kísérlet 25. napján (3. CT vizsgálat), a *P. multocida* fertőzés és FB₁ toxin fogyasztása után 9 nappal már sokkal markánsabbá váltak. A C. és D. csoport egy-egy állatánál találtunk csak a *P. multocida* fertőzést követően elváltozást. Két állatnál (C. és D. csoport egy-egy állat) figyeltünk meg enyhefokú elváltozást a *B. bronchiseptica* fertőzés után, amely a kísérlet végére nem volt érzékelhető sem a CT felvételeken, sem a boncolás során. A *B. bronchiseptica* fertőzés után az elváltozások lebenyre, lebenykére kiterjedő diffúz jellegűek voltak, amelyek a *P. multocida* fertőzés után kisebb, jól körülhatárolt, gócos formát öltöttek.

3. kísérlet

A fertőzést követően (31. naptól) az C. és D. csoportban testhőmérséklet emelkedés (39,5 – 40,8 °C), majd a 37. naptól klinikai tünetek (köhögés, tüsszögés, rekedt hang, nehezített légzés) jelentkeztek. A kísérletünk során egy elhullás történt a fertőzött és toxinnal kezelt csoportból. A két fertőzött csoport (C. és D.) összes egyedében a fertőzést követően 14 nappal elvégzett CT felvételeken már jól látható, gyulladásra utaló tüdőelváltozásokat figyeltünk meg. Ezek az elváltozások kezdetben a kisebb légutak körül mutatkoztak, melyek tovább terjedtek, és a kísérlet végén (58. nap) több állatban is nagyobb kiterjedésben jelentkeztek. A tüdők leginkább érintett területei a lebenyek craniális részei voltak. A kórboncolás során, a CT felvételeken észlelt kiterjedéssel megegyezően találtunk heveny - félheveny hurutos gyulladásos tüdőterületeket az érintett állatokban.

A *M. hyopneumoniae* fertőzés önmagában is képes volt tüdőelváltozást előidézni a növendék malacokban. A FB₁ toxin fogyasztása súlyosbította ezen elváltozásokat. A mortalitás, az észlelt tüdőelváltozások, valamint ezek kiterjedése is egyaránt a D. csoportban volt a legmagasabb. Következtetésként elmondható, hogy a *M. hyopneumoniae* fertőzés és a FB₁ toxin fogyasztása együttesen növeli a sertésben kialakuló tüdőgyulladás esélyét, valamint súlyosbítja az elváltozások kiterjedését és jellegét.

Az általunk alkalmazott, a CT vizsgálat ideje alatt meghatározott nyomáson tartott tüdők felvételei alkalmasnak bizonyultak a tüdőelváltozások kimutatására. A tüdőben kialakuló elváltozások kiértékelésére egy új modell alkalmazásával a 3. kísérletben az átlagdenzitás értékeket számszerűsítve a fertőzött és a nem fertőzött egyedek között szignifikáns különbséget mutattunk ki. A tüdő kijelölt területeiről gyűjtött összesített pixelgyakorisági értékekből számított átlagérték (átlagdenzitás) alakulását a kezelés és az életkor (a vizsgálat időpontja) szignifikánsan befolyásolta, a két hatás között interakció volt kimutatható. A 30. és 44. nap között csökkent ($P < 0.01$) az átlagdenzitás, a 44.-58. nap között nem változott. A fertőzött csoportok tüdejének átlagdenzitása 5-10 %-al magasabb volt a nem fertőzött egyedekéhez képest ($P < 0.001$). A fertőzött állatokban (M és MF csoport) az átlagdenzitás értékek a 44. és 58. napon nem különböztek szignifikánsan a 30. napi értékektől. A számszerűsített modell alkalmazásával azonban nem tudtunk szignifikáns hatást kimutatni sem a fertőzött, sem a fertőzéstől mentes csoportokban a FB₁ kezelés hatására. A FB₁ toxint 20 ppm dózist tartalmazó takarmány etetése csak szövettani és enyhe makroszkópos elváltozást, oedemát eredményezett a kezelt csoportok tüdejében. A CT felvételeket elemezve ezt a mértékű oedemát nem tudtuk határozottan kimutatni.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az általunk alkalmazott malacfelnevelési módszerrel meg tudtuk akadályozni légzőszervi kórokozók megtelepedését a kísérleti állatokban, így vizsgálni tudtuk az általunk mesterséges fertőzés útján a légutakba jutott légzőszervi kórokozók által kialakított tüdőelváltozások kórfejlődését.

Igazolni tudtuk, hogy a *B. bronchiseptica* illetve a *M. hyopneumoniae* fertőzés önmagában is előidézik tüdőgyulladást fiatal, illetve növendék malacokban.

Kísérleteinkben az egyes vizsgálati napokon nem találtunk szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) a csoportok átlagos testsúlyában (1-3. kísérlet), bár a fertőzött és FB₁ toxinnal együttesen kezelt csoportokban tartott állatok növekedése elmaradt a másik három csoportban tartott állatokhoz képest (2-3. kísérlet).

Az általunk elvégzett 2. és 3. kísérlet eredményeként elmondható, hogy a *B. bronchiseptica* és *P. multocida* kettős fertőzés, illetve a *M. hyopneumoniae* fertőzés mellett a FB₁ toxin 10 mg/kg illetve 20 mg/kg koncentrációban történő fogyasztása a csoporton belül fokozta a klinikai tünetek súlyosságát, magasabb volt a mortalitás és növelte a tüdőgyulladás esélyét, mivel a toxinfogyasztó állatok nagyobb számban mutattak tüdőelváltozást.

Kidolgoztuk a komputertomográfias módszer alkalmazásának lehetőségét a tüdőgyulladások időben történő megjelenésének és kórfejlődésének a vizsgálatára, amely hasznos információkat szolgáltathat további légzőszervi kórképek vizsgálataihoz. A komputertomográfia nagy előnye, hogy a betegség megjelenésével egyidejűleg nyomon követhető az élő állatokban is a tüdőben kialakuló kóros elváltozások lokalizációja, kiterjedése és jellege. A különböző időpontokban elvégzett CT felvételek

értékelésekor új tudományos ismereteket gyűjthetünk az egyes légzőszervi betegségek kórfejlődésének megismeréséhez, vagy akár alkalmazott kísérletek keretében a kórképekre gyakorolt terápiás kezelések hatékonyságának összehasonlító vizsgálatára is.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A komputer tomográfia alkalmas diagnosztikai módszernek bizonyult a sertések alsó légútjainak vizsgálatára.
2. Kidolgoztunk egy új módszert a sertések tüdejének képalkotó diagnosztikai módszerrel (CT) történő vizsgálatára, amelynek segítségével lehetővé vált élő állatban a légzőkészülék térbeli és időbeni kvantitatív elemzése a tüdőben zajló kórtani folyamatok tekintetében.
3. A *B. bronchiseptica* fertőzés önmagában is előidézik tüdőgyulladást fiatal malacokban.
4. A *B. bronchiseptica* és *P. multocida* kettős fertőzés mellett a FB₁ toxin 5 mg/kg határértéket meghaladó, 10 mg/kg koncentrációban történő fogyasztása súlyosbítja a bakteriális megbetegedés lefolyását.
5. A *M. hyopneumoniae* fertőzés mellett a FB₁ toxin 5 mg/kg határértéket meghaladó 20 mg/kg koncentrációban történő fogyasztása súlyosbítja a bakteriális megbetegedés lefolyását.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBŐL ÍRT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Tudományos közlemények idegen nyelvű referált folyóiratban

Pósa R., Kovács M., Szabó-Fodor J., Mondok J., Bogner P., Repa I., Magyar T. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* and fumonisin B₁ toxin on the lung in pigs. Italian Journal of Animal Science. 2009. 8(3):172-174.

Pósa R., Kovács M., Donkó T., Repa I., Magyar T. Non invasive (CT) investigation of the lung in *Bordetella bronchiseptica* infected pigs. Agriculturae Conspectus Scientificus. 2011. 76(4): 357-359.

Pósa R., Donkó T., Bogner P., Kovács M., Repa I., Magyar T. Interaction of *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and fumonisin B₁ in the porcine respiratory tract followed up by computed tomography. Canadian Journal of Veterinary Research. 2011. 75(3):176–182.

Pósa R., Magyar T., Stoev S.D., Glávits R., Donkó T., Repa I., Kovács M. Use of computed tomography and histopathologic review for lung lesions produced by the interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and fumonisin mycotoxins in pigs. Veterinary Pathology. 2013. 50:(6):971-979.

Konferencia kiadványban idegen nyelven megjelent abstract

Pósa R., Donkó T., Bogner P., Kovács M., Repa I., Magyar T. Synergy between *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and fumonisin B₁ toxin in the porcine respiratory tract. Proceedings of IPVS Congress, Durban, 2008. pp.:195.

Pósa R., Kovács M., Szabó-Fodor J., Mondok J., Bogner P., Repa I., Magyar T. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and fumonisin B₁ toxin in the porcine respiratory tract. In: D'Allaire S, Friendship R (ed) Proceedings 21th International Pig Veterinary Society Congress (IPVSC), Vancouver, Canada. 2010. pp.:654:348.

Előadások

Pósa R., Donkó T., Bogner P., Kovács M., Repa I., Magyar T. A fumonizin B₁ hatásának vizsgálata *Bordetella bronchiseptica* és *Pasteurella multocida* kórokozókkal fertőzött sertésekben. MTA Állatorvostudományok Bizottsága, Akadémiai beszámoló. Budapest, Hungary, 28 January 2009.

Pósa R., Kovács M., Donkó T., Szabó-Fodor J., Mondok J., Bogner P., Repa I., Magyar T. A *Mycoplasma hyopneumoniae* és a fumonizin B₁ mikotoxin kölcsönhatása sertések tüdejében. MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló. Budapest, Hungary, 27 January 2010.